

*На правах рукописи*

**АСАТРЯН  
Татевик Тиграновна**

**ОПТИМИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ  
НАСЛЕДСТВЕННОГО СФЕРОЦИТОЗА**

14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург – 2022

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук доцент **Гайковая Лариса Борисовна**

**Официальные оппоненты:**

**Богданов Александр Николаевич** - доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт – Петербургский государственный университет» Правительства Российской Федерации, кафедра последипломного медицинского образования, профессор, выполняющий лечебную работу;

**Соснин Дмитрий Юрьевич** - доктор медицинских наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра факультетской терапии № 2, профпатологии и клинической лабораторной диагностики, профессор.

**Ведущая организация:** федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «7» июня 2022 г. в 12:00 часов на заседании диссертационного совета Д 205.001.01, созданного на базе ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 4/2

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 197374, Санкт-Петербург, ул. Оптиков, д. 54 и на сайте <https://nrcerm.ru/>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
кандидат медицинских наук доцент

**Санников Максим Валерьевич**

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность темы исследования.**

Наследственный сфероцитоз (НС) - это наследственное заболевание, связанное с дефектом белков мембраны эритроцита, сопровождающееся развитием гемолитической анемии (ГА) различной степени тяжести [Gallagher PG., 2013].

В 75% случаев наследование НС происходит аутосомно-доминантно, 25% случаев включают в себя аутосомно – рецессивно наследуемые мутации в гене, возникшие *de novo*. Пациенты с не доминантным НС представляют собой большую нерешенную проблему при генетическом консультировании [He VJ, 2018].

НС встречается во всех этнических и расовых группах [Мицура Е.Ф., 2011]. В Северной части Европы НС является самой распространенной причиной наследственной ГА и встречается с частотой 1:2500, в США - 1:5000 [Bolton-Maggs PH, Langer JC, Iolascon A, et al., 2011]. Распространенность НС в других популяциях изучена недостаточно [Мицура Е.Ф., 2011].

Тяжесть заболевания определяется генетически унаследованным типом повреждения мембраны эритроцитов и количеством микросфероцитов в крови. Степень тяжести гемолиза у различных пациентов варьирует и может осложниться инфекцией [Gallagher PG. 2013].

Заболеваемость НС в России растет, тем самым формируя необходимость создания лабораторного алгоритма, направленного на поиск пациентов с НС. В настоящее время существуют федеральные рекомендации по диагностике и лечению НС, однако единого подхода к выявлению НС не разработано. Врачи гематологи, терапевты и педиатры нередко сталкиваются с проблемой неправильной интерпретации результатов лабораторных исследований. Это особенно актуально при атипичных вариантах НС или при сочетании НС с другими патологиями [Румянцев А.Г., 2015]. Расширение панели биохимических тестов, автоматический расчет интегральных эритроцитарных параметров и их введение в лабораторную информационную систему (ЛИС) для диагностики НС является первым шагом к повышению эффективности дифференциальной диагностики врожденных гемолитических анемий [Тао YF et.al., 2015; Cierpiela O. 2017; Tatekawa Y., 2018; Petkova-Kirova P, et.al. 2019].

Таким образом, разработка алгоритма лабораторной диагностики НС упростит этап проведения дифференциальной диагностики, выявление пациентов с подозрением на НС и поможет в создании реестра пациентов с НС. Все эти вопросы послужили основанием для проведения диссертационной работы.

### **Степень разработанности темы**

Диагностика НС основана на данных семейного анамнеза, обнаружения измененных форм эритроцитов в мазке периферической крови и наличии у пациента типичных признаков гемолиза [Qin L., Nie Y., Zhang H. et al., 2020]. В США, Европе предложены национальные руководства по диагностике и

лечению НС, которые основываются на данных различных видов лабораторных исследований, направленных на поиск пациентов с НС [Gallagher PG., 2013].

В 2015 г в РФ были разработаны «Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению наследственного сфероцитоза у детей» [Румянцев А.Г., 2015]. В перечень рекомендуемых тестов входят клинический анализ крови, биохимический анализ крови (определение уровня билирубина и его фракций, активности фермента лактатдегидрогеназы), электрофорез мембранных белков эритроцитов по Лэммли и тест на связывание красителя эозин-5-малеимида (ЭМА–тест). В значительной степени эти рекомендации охватывают «классический» вариант НС, не учитывая латентные, атипичные и сочетанные с другими патологиями формы. В подобных случаях возникают большие сложности в дифференциальной диагностике, окончательной постановке диагноза и лечении пациентов. Кроме того, не сформулированы критерии диагностики и трактовки полученных результатов лабораторных исследований [Мицура Е.Ф., 2011; Румянцев А.Г., 2015].

Проблеме повышения эффективности дифференциальной диагностики НС, многообразию клинических проявлений, поиску молекулярных основ развития НС и закономерностям его наследования посвящено много публикаций [Gallagher PG., 2013, Iolascon A, et.al., 2017, He B, et.al. 2018, He Y, 2017]. Однако нет общего алгоритма лабораторной диагностики НС, не разработаны методы скрининга НС, не ведется реестр пациентов с НС. Все это превращает процесс дифференциальной диагностики гемолитических анемий в трудоемкий процесс.

#### **Цель исследования**

Разработать и обосновать алгоритм лабораторной диагностики наследственного сфероцитоза с использованием комплекса исследований морфологии и свойств мембран эритроцитов в периферической крови.

#### **Задачи исследования**

1. Провести сравнение клинического анализа крови, морфометрических параметров эритроцитов, скорости лизиса эритроцитов и теста на связывание красителя эозин-5-малеимида у пациентов с наследственным сфероцитозом, другими типами гемолитических анемий и у «здоровых» лиц.

2. Оценить чувствительность и специфичность интегральных расчетных индексов эритроцитов, морфометрических параметров эритроцитов, скорости лизиса эритроцитов и теста на связывание красителя эозин-5-малеимида, используемых для диагностики наследственного сфероцитоза.

3. Оценить значимость модифицированного глицеринового теста по определению скорости лизиса эритроцитов для выявления микросфероцитов.

4. На основании диагностически значимых тестов разработать алгоритм лабораторной диагностики наследственного сфероцитоза.

### **Научная новизна и теоретическая значимость работы**

Впервые проведен сравнительный анализ аналитических характеристик основных лабораторных тестов для верификации наследственного сфероцитоза. Определены значения Cut-Off расчетных эритроцитарных индексов для выявления пациентов с наследственным сфероцитом.

Модифицирован способ выявления микросфероцитов «Глицериновый тест по определению скорости лизиса эритроцитов».

Впервые разработан лабораторный алгоритм диагностики наследственного сфероцитоза с использованием набора современных лабораторных маркеров.

### **Практическая значимость работы**

Расширение панели биохимических тестов, автоматический расчет интегральных эритроцитарных параметров и их введение в лабораторную информационную систему (ЛИС) для выявления пациентов с НС повышают эффективность дифференциальной диагностики врожденных гемолитических анемий. Своевременная диагностика НС позволит снизить риск ошибок при дифференциальной диагностике различных видов гемолитических анемий и назначении необоснованной лекарственной терапии, что освободит пациента и медицинскую организацию от ненужных дополнительных обследований.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Расчет интегральных эритроцитарных индексов (Hb/RDW и MCHC/RDW) по данным клинического анализа крови при первичном обследовании клинически бессимптомных лиц позволяет выделить пациентов с высокой вероятностью наличия наследственного сфероцитоза.

2. У пациентов с высокой вероятностью НС наличие микросфероцитов следует подтверждать изменением морфометрических параметров эритроцитов и/или скорости лизиса инкубированных эритроцитов с помощью глицеринового теста.

3. Лабораторный алгоритм диагностики НС включает определение двух эритроцитарных индексов (Hb/RDW и MCHC/RDW) для выявления пациентов с подозрением на НС, оценку морфометрических параметров эритроцитов и/или скорости лизиса эритроцитов для подтверждения наличия микросфероцитов и проведение теста на связывание красителя эозин-5-малеимида для подтверждения наследственного характера заболевания.

### **Методология и методы исследования**

Дизайном исследования является проспективное когортное исследование. Были проведены сбор и реферирование литературы, в исследовании использовались соответствующие методы параметрической и непараметрической статистической обработки данных, а также построение статистических графиков и проведение ROC-анализа. Лабораторные исследования выполнены на соответствующем оборудовании, в соответствии с правилами проведения контроля качества.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Материалы диссертационного исследования были доложены и обсуждены на Юбилейной конференции, посвященной 90-летию кафедры клинической лабораторной диагностики «Лаборатория вчера, сегодня, завтра» (Санкт-Петербург, 2016); 2-м, 3-м, 4-м конгрессе лабораторной медицины (Москва 2016, 2017, 2018); Всероссийской научно–практической конференции с международным участием «Профилактическая медицина – 2017» (Санкт-Петербург, 2017); Научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Трансляционная медицина: от теории к практике – 2017» (Санкт-Петербург, 2017); I-ом ежегодном конгрессе «Будущее здорового общества» (Ереван, 2018); IV Научно-практической конференции «Актуальные вопросы высокотехнологичной помощи в терапии» (Санкт-Петербург, 2020); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине» (Санкт-Петербург, 2020).

### **Внедрение результатов исследования в практику**

Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедры биологической и общей химии им. В.В. Соколовского ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России и в практическую деятельность Центральной клинико-диагностической лаборатории ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России.

### **Личный вклад автора**

Автор лично сформулировала цель и задачи исследования, самостоятельно собрала данные литературы, составила дизайн исследования, выполнила обработку материалов, обобщила и проанализировала полученные результаты. Автор самостоятельно провела исследование эритроцитарных параметров, тест на связывание красителя эозин-5-малеимида, расчет морфометрических параметров эритроцитов, разработала метод определения скорости лизиса эритроцитов. Лично автором выполнен подробный анализ полученных данных с последующей статистической обработкой, сформулированы обоснованные выводы и разработаны практические рекомендации.

### **Публикация результатов исследования**

По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых научных изданиях и журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 125 страницах, состоит из введения, обзора литературы, главы материалов и методов, результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, который включает 117 источников, из них 90 зарубежных. Диссертация содержит 24 таблицы, 36 рисунков.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы исследования

Исследование было выполнено на базе центральной клинико-диагностической лаборатории федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

В исследование были включены 76 пациентов (39 мужчин, 37 женщин) различных возрастных групп (от 2 лет до 61 года, среднее  $25,8 \pm 14,5$  года, медиана 25,0), находившихся на обследовании и лечении в СПб ГБУЗ «Консультативно-диагностический центр для детей», ФГБУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА России» и ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России в период с октября 2015 г. по ноябрь 2018 г.

На момент исследования пациенты проживали в г. Санкт-Петербурге, обследованную группу составили пациенты с подозрением на наличие или с подтвержденным ранее диагнозом «наследственный сфероцитоз», другого типа ГА, а также «здоровые» лица (с отсутствием гематологических заболеваний, которые были определены в I или II группу здоровья).

Из исследования были исключены дети младше 6 месяцев, поскольку в этот период наличие микросфероцитов считается вариантом нормы [Румянцев А.Г., 2015].

По результатам проведенного лабораторного обследования пациенты были разделены на 3 группы: основную, группу сравнения и контрольную.

Основную группу составили 18 пациентов с наследственным сфероцитозом (по МКБ-10: D58.0: ахолурическая (семейная) желтуха, врожденная (сфероцитарная) гемолитическая желтуха, синдром Минковского-Шоффара). Пяти пациентам в связи с тяжелым течением заболевания ранее была проведена спленэктомия.

Группа сравнения (n=32) – это гетерогенная группа, включающая пациентов с различными типами несфероцитарных ГА.

Контрольную группу составили 25 человек с отсутствием гематологических заболеваний.

Характеристика групп пациентов, вошедших в исследование, представлена в таблице 1.

Таблица 1. Демографическая характеристика групп больных

Демографический показатель		Основная группа (наследственный сфероцитоз, n=18)	Группа сравнения (гемолитические анемии, n=32)	Контрольная группа («здоровые» лица, n=25)
возраст	медиана	25,5	27,0	20,0
	мин-макс	6 - 61	8 - 56	2 - 61
пол	мужской	9	16	13
	женский	9	16	12

Всем пациентам однократно были проведены гематологические и биохимические исследования. Гематологические исследования включали клинический анализ крови (КАК); расчет интегральных эритроцитарных параметров (Hb/RDW, MCHC/RDW); микроскопия мазка периферической крови с описанием морфологии эритроцитов; расчет морфометрических параметров эритроцитов; биохимические - определение скорости лизиса эритроцитов с использованием глицеринового теста; тест на связывание красителя эозин-5-малеимида (ЭМА-тест).

Клинический анализ крови выполняли не позднее 6 часов от момента забора крови на 3 DIFF гематологическом анализаторе Sysmex KX- 21N (Sysmex, Япония).

Оценивали концентрацию гемоглобина (Hb, г/л), количество эритроцитов (RBC,  $\times 10^{12}/л$ ), средний объем эритроцита (MCV, фл), среднее содержание гемоглобина в отдельном эритроците (MCH, пг), среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците (MCHC, г/л), ширину распределения эритроцитов по объему (RDW, %), гематокрит (HCT, %). Для оценки результатов использовали возрастные референтные значения. Также в рамках КАК рассчитывали интегральные эритроцитарные индексы Hb/RDW и MCHC/RDW, так как по данным Rocha et.al. (2012) они имеют большую специфичность и чувствительность для скрининга НС, чем эритроцитарные параметры, полученные при помощи гематологического анализатора.

Мазки периферической крови фиксировали в течение 2-3 минут в фиксаторе Май-Грюнвальд, затем красили методом погружения в 10% раствор красителя Романовского-Гимзы в течение 10 минут.

Расчет морфометрических параметров эритроцитов проводился методом микроскопии окрашенных мазков периферической крови при помощи АПК ВидеоТест-Морфология. АПК состоит из микроскопа с встроенной системой ввода изображений, компьютера и соответствующего программного обеспечения (рисунок 1). Расчет морфометрических параметров производился по формулам, приведенным в таблице 2.

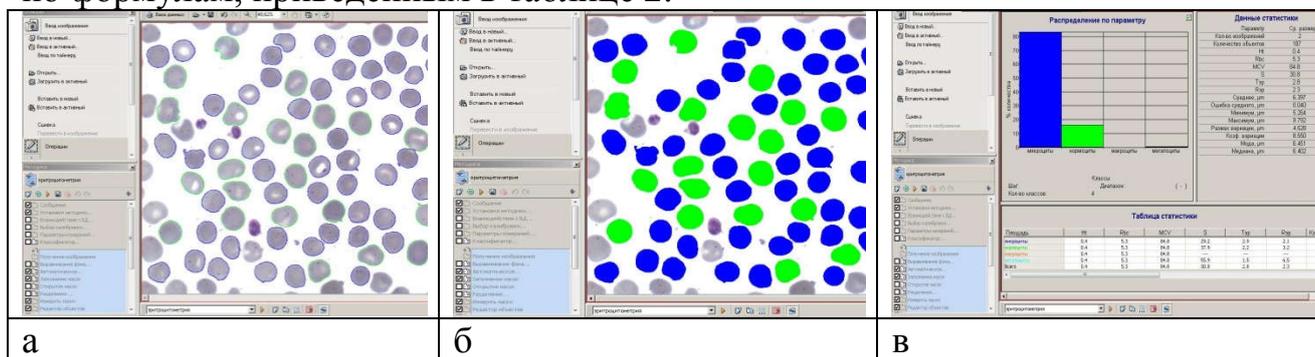


Рисунок 1. Этапы анализа изображений мазков периферической крови с использованием АПК «ВидеоТест-Морфология». а) загрузка изображения в программу, выделение эритроцитов, б) распределение эритроцитов на классы в зависимости от диаметра (микроциты (4,0 – 6,9 мкм), нормоциты (6,9 – 8,0 мкм), макроциты (8,0 – 9,5 мкм), мегалоциты (9,5 – 11,0 мкм)), в) результат.

Таблица 2. Параметры и формулы, используемые для расчета эритроцитарных параметров аппаратно-программным комплексом.

Показатель	Формулы для расчета	Размерность	Референтные значения
Измеряемые параметры			
Средняя площадь эритроцитов	$S_{эп.} = \pi\tau^2$	мкм <sup>2</sup>	-
Средний диаметр эритроцитов	$D_{эп.} = 2\tau$	мкм	7,2 – 7,5
Расчетные параметры			
Толщина эритроцитов	$T_{эп.} = \frac{MCV}{S}$	мкм	1,7 - 2,3
Индекс сферичности	$R_{сф} = \frac{D}{T}$	-	3,4 ÷ 3,9

*Определение скорости лизиса эритроцитов.* Лизис эритроцитов оценивали с помощью глицеринового теста. Регистрацию скорости разрушения эритроцитов проводили на автоматическом биохимическом анализаторе Sapphire-400 (США). Изменение оптической плотности (ОП) регистрировали в течение 10 минут при 37°C (длина волны 625 нм).

Приготовление реактива: 11 мл (13,81 г) глицерина растворяли в 400 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ) с рН=6,85 и доводили объем до 1 л дистиллированной водой. Реактив хранили при температуре 2 – 8 °С.

Ход определения: анализатором автоматически в кювету дозировалось 297 мкл реактива, нагревалось до температуры реакции, затем в ту же кювету вносилось 3 мкл цельной крови. После перемешивания пробы незамедлительно начиналась непрерывная регистрация снижения ОП в течение 10 минут.

Результат выражали в виде разницы между начальной и конечной ОП, умноженной на 1000. Кроме того, скорость лизиса эритроцитов оценивали визуально по форме графика изменения ОП со временем.

*Тест на связывание красителя эозин-5-малеимида (ЭМА-тест)* дает возможность оценить целостность цитоскелета эритроцита путем связывания флуоресцентного красителя эозин-5-малеимида с белком полосы 3 цитоскелета эритроцита.

Исследование проводили в 5 этапов: отмывание эритроцитов, инкубация с красителем эозин-5-малеимидом, отмывка эритроцитов от несвязавшегося красителя, проявление красителя в ФСБ, измерение средней интенсивности флуоресценции в процентах (СИФ). Эритроциты отмывали 3 раза в физиологическом растворе: к 100 мкл цельной крови добавляли 1,5 мл физиологического раствора, аккуратно перемешивали при помощи лабораторного встряхивателя «Вортекс персональный V-1» (Biosan, Латвия, РУ № ФСЗ 2011/09797) и центрифугировали 5 минут при скорости центрифуги 1500 об/мин, повторяли 3 раза. Далее 10 мкл отмытых эритроцитов инкубировали с 25 мкл красителя эозин-5-малеимида (флуоресцентный краситель N-(5-Флуоресценил) малеимид (производство компании «Сигма»,

США) при комнатной температуре в темноте в течение часа. После инкубации отмывку эритроцитов повторяли 2 раза для удаления несвязавшегося красителя. После этого полученные эритроциты инкубировали 15 минут при комнатной температуре в темноте с добавлением 600 мкл ФСБ (pH=7,0). Под воздействием ФСБ флуоресценция связавшегося с белком эозин-5-малеимида проявляется. Далее проводили измерение интенсивности флуоресценции с расчетом СИФ на проточном цитометре FC500 (Beckman Coulter) с использованием программы CXPanalysis по данным 50000 эритроцитов, гейтированных по параметрам светорассеяния.

В каждой аналитической серии СИФ пациента с подозрением на наличие НС сопоставляли с СИФ 3-х пациентов с отсутствием гематологических заболеваний, при условии, что забор крови всех пациентов производился в один день, пробы хранились в одинаковых условиях, анализ выполнялся одномоментно.

В связи с нестабильностью красителя эозин-5-малеимид в разведенном состоянии и отсутствием контрольных материалов, результат представляли, как отношение СИФ пациента к сумме СИФ «здоровых» лиц в 1 аналитической группе, выраженный в процентах.

$$\% = \frac{\text{СИФ пациента}}{\sum \text{СИФ доноров}} \times 100\%$$

Статистическую обработку полученных результатов производили с использованием параметрических и непараметрических методов статистики. Методы описательной статистики включали в себя оценку среднего арифметического (M), стандартного отклонения (SD), медианы (Me), нижний (25) и верхний (75) квартили. Для оценки нормальности распределения применяли критерий Колмогорова-Смирнова (d). Для оценки межгрупповых различий значений признаков, имеющих непрерывное распределение, применяли t-критерий Стьюдента, ранговый U-критерий Манна – Уитни. Критический уровень достоверности нулевой статистической гипотезы принимали равным 0,05.

Диагностическую ценность исследуемых маркеров оценивали с помощью построения характеристической кривой (ROC-кривая, Receiver Operating Characteristic, ROC-curve), которая показывает отношение доли истинно положительных результатов (чувствительность) к доле истинно отрицательных случаев (специфичность). Точки наиболее оптимального расположения пересечения на ROC-кривой положительных и отрицательных примеров определяются как пороговые значения, или Cut-off. Для получения численного значения клинической значимости теста, а также для сравнения двух тестов, использовали показатель AUC (Area Under Curve), или значение площади под характеристической ROC-кривой. Этот показатель оценивали по общепринятой экспертной шкале, при которой интервал AUC 0,9 – 1,0 характеризует качество модели как «отлично», 0,8 – 0,9 – как «очень хорошо», 0,7 – 0,8 – «хорошо», 0,6 – 0,7 «удовлетворительно» и 0,5 – 0,6 «неудовлетворительно». Статистическую

обработку материала выполняли с использованием программ прикладного статистического анализа (Statistica for Windows, v. 6.0).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Результаты исследования клинического анализа крови с расчетом основных и интегральных эритроцитарных параметров

Использование гематологических анализаторов, основанных на принципе Култера, обеспечивает расчет основных эритроцитарных параметров и интегральных эритроцитарных индексов.

Результаты исследования основных эритроцитарных параметров в группах представлены в таблице 3.

Таблица 3. Основные эритроцитарные параметры в группах. Приведены медиана (Me), нижний (25) и верхний (75) квартили

Показатель	Группы		
	НС (наследственный сфероцитоз)	ГА (гемолитические анемии)	«Здоровые» лица
RBC, $\times 10^{12}/л$	4,4(3,6; 5,1)	4,6 (3,1; 5,1)	4,6(4,3;4,7)
Hb, г/л	133 (115; 149)**	121,5(110;136,5)***	137 (127;145)
MCV, фл	83,3 (80,1; 87,7)	79,7(71,2;88,7)	83(82; 85,6)
MCH, пг	30,7(29,40; 32,40)	28,9(24,8;32,2)	30(29,4; 31)
MCHC, г/л	366,5(356; 373)**	350,5(336,5; 363,5)	364 (353; 367)
RDW, %	16(14; 19,2)*	15,2(13,8; 17,4)***	13,3(13; 13,7)

Непараметрический ранговый U-критерий Манна Уитни

\*достоверные различия ( $p < 0,05$ ) между группами НС и «здоровые»

\*\*достоверные различия ( $p < 0,05$ ) между группами НС и ГА

\*\*\*достоверные различия ( $p < 0,05$ ) между группами ГА и «здоровые»

Данные, полученные с помощью гематологического анализатора Sysmex КХ-21N, не выявили достоверных различий по большинству из приведенных в таблице параметров между группами пациентов, за исключением RDW, свидетельствующим о наличии анизоцитиоза.

Далее нами изучались интегральные эритроцитарные индексы Hb/RDW и MCHC/RDW в группах (таблица 4).

Также были проанализированы аналитические характеристики основных эритроцитарных параметров (рисунок 2а) и интегральных эритроцитарных индексов (рисунок 2б) с использованием ROC-анализа. Оценивали чувствительность и специфичность тестов (таблица 5).

Значение AUC (площади под кривой) у эритроцитарных параметров, полученных с помощью гематологического анализатора, находилось в диапазоне 0,31 – 0,51, что позволило охарактеризовать качество тестов как «неудовлетворительно».

Значение AUC (площади под кривой) у расчетных эритроцитарных индексов составило 0,808 для Hb/RDW и 0,800 для MCHC/RDW. Значение AUC позволило оценить клиническую значимость тестов: для индекса Hb/RDW как «хорошо» и для MCHC/RDW - «удовлетворительно».

Чувствительность исследуемых расчетных эритроцитарных параметров составила 83,3% для Hb/RDW и 88,8% для MCHC/RDW, специфичность – 65,2% для Hb/RDW и 52,17% для MCHC/RDW.

Таблица 4. Результаты анализа интегральных эритроцитарных параметров в группах. Приведены медиана (Me), нижний (25) и верхний (75) квартили

Показатель	Группы		
	НС (наследственный сфероцитоз)	ГА (гемолитические анемии)	«Здоровые» лица
Hb/MCHC	0,37 (0,32;0,41)	0,36 (0,31;0,39)	0,38 (0,36;0,40)
Hb/RDW	7,84 (7,07;9,66)*	8,02 (6,09; 9,75)**	10,33 (9,38;10,89)
MCHC/RDW	22,55 (18,43;26,36)*	22,90 (19,56;25,09)**	26,89 (25,75;27,95)

Непараметрический ранговый U-критерий Манна Уитни

\*достоверные различия ( $p < 0,05$ ) между группами НС и «здоровые»

\*\*достоверные различия ( $p < 0,05$ ) между группами ГА и «здоровые»

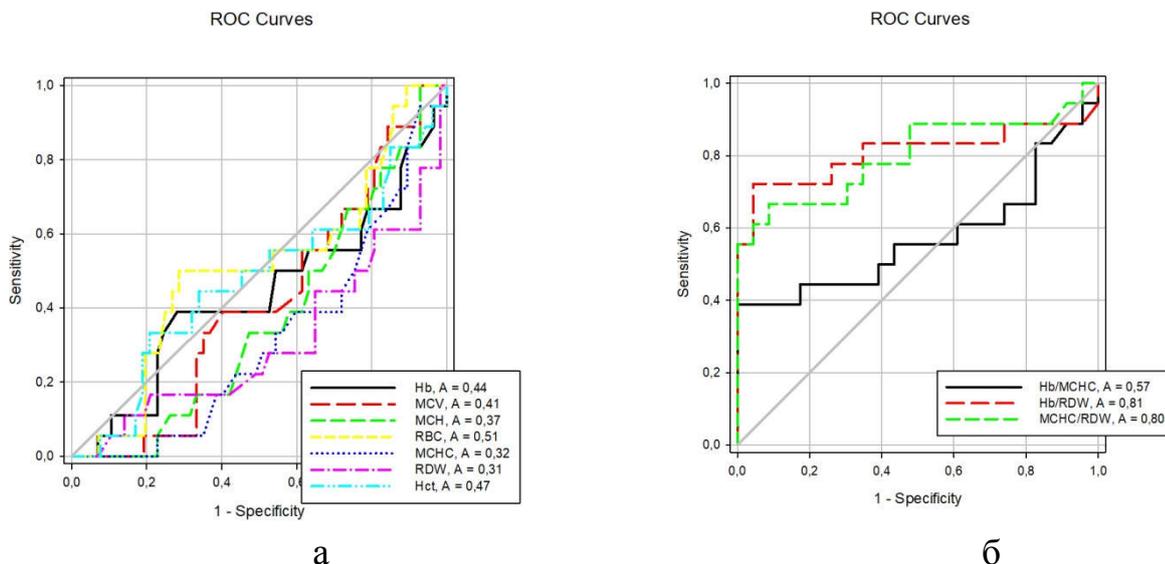


Рисунок 2. ROC-кривая для основных (а) и расчетных (б) эритроцитарных параметров.

Таблица 5. Пороговые значения, чувствительность и специфичность расчетных эритроцитарных индексов, полученные в ходе исследования

	Пороговое значение	Чувствительность	Специфичность
MCHC/RDW	$\leq 24,3$	88,8%	52,17%
Hb/RDW	$\leq 8,7$	83,3%	65,2%

По данным литературы, параметры Hb/RDW, MCHC/RDW могут использоваться для выявления пациентов с НС при выполнении КАК. В нашем исследовании при сравнении основных и расчетных эритроцитарных параметров в основной группе (НС, n=18) и группе сравнения (ГА, n=32) ни один из параметров не оказался эффективным для скрининга НС. Это указывает на то, что описанные изменения связаны с изменением показателей Hb и RDW в КАК и могут быть при любом из типов ГА. Таким образом, использование данных, полученных при помощи гематологического анализатора и расчетных параметров Hb/RDW и MCHC/RDW дает возможность только предположить у пациента наличие одного из типов ГА, но не указывает на наличие именно НС.

#### **Морфометрические параметры эритроцитов.**

Анализ мазка крови с применением аппаратно-программного комплекса (АПК) позволяет с большей степенью установить различия в форме эритроцитов в количественной форме, что позволяет уточнить характер анемии (таблица 6).

Как следует из представленных данных, анализ морфометрических параметров позволяет выявить достоверные различия в группах по всем изученным параметрам. Среди них наиболее значимыми для дифференциальной диагностики микросфероцитарной анемии являются: толщина эритроцитов (Тэр), индекс сферичности эритроцитов (Рэр) и средний диаметр эритроцитов (Дэр) (таблица 7).

Как видно из приведенных данных специфичность и чувствительность морфометрических параметров эритроцитов составили 100%. Это свидетельствует о том, что предложенный метод подходит для дифференцировки микросфероцитов от нормоцитов. Описанная методика не дает возможности автоматического описания изменения формы эритроцитов (пойкилоцитоза эритроцитов).

Полученные нами результаты указывают на то, что измерение объема эритроцитов с помощью автоматизированного гематологического анализатора не должно и не может заменить собой полностью исследования их диаметра и толщины. Если исходить из фактов, свидетельствующих о том, что развитие анемии чаще всего сопровождается изменением формы эритроцитов – диаметра, толщины и объема, то следует признать целесообразным изучение всех трех показателей [Зенина М.Н., 2015].

Таким образом, использование в лабораториях систем анализа изображения позволяет при микроскопическом анализе выявлять параметры эритроцитов, необходимые для дифференциальной диагностики анемий.

Таблица 6. Значения эритроцитарных показателей, полученных с помощью аппаратно-программного комплекса. Приведены среднее значение (M) и стандартное отклонение (SD)

Исследуемые параметры	НС (наследственный сфероцитоз)	«Здоровые» лица	Значения p
Толщина эритроцитов микроцитов (Т <sub>мэр</sub> ), мкм	2,9±0,2	2,3±0,2	0,001
Толщина эритроцитов (Т <sub>эр</sub> )	2,6 ± 0,3	2,1± 0,2	0,005
Индекс сферичности эритроцитов микроцитов (R <sub>мэр</sub> )	2,2± 0,2	2,8± 0,2	0,003
Индекс сферичности эритроцитов (R <sub>эр</sub> )	2,3 ± 0,1	3,7±0,3	0,005
Средний диаметр эритроцитов (D <sub>эр</sub> )	6,6 ± 0,2	7,5±0,2	0,005
Содержание микроцитов (% микр)	68,7 ± 16,9	12,6± 6,7	<0,001
Содержание нормоцитов (% норм)	30,4 ± 16,5	72,9± 7,3	<0,001
Содержание макроцитов (% макр)	1,9± 1,2	14,5± 11,8	<0,001

Таблица 7. Пороговые значения, чувствительность и специфичность морфометрических эритроцитарных параметров.

Индексы	Пороговое значение	Чувствительность	Специфичность
Толщина эритроцитов (Т <sub>эр</sub> )	≥ 2,1	100%	100%
Индекс сферичности (R <sub>эр</sub> )	≤ 2,3	100%	100%
Диаметр эритроцитов (D <sub>эр</sub> )	≤ 6,2	100%	100%

**Изучение скорости лизиса эритроцитов с использованием глицеринового теста.**

Результаты глицеринового теста на определение скорости лизиса эритроцитов с кровью сразу после взятия в группах приведены в таблице 8.

Чувствительность и специфичность теста составили 77% и 96% соответственно (рисунок 3).

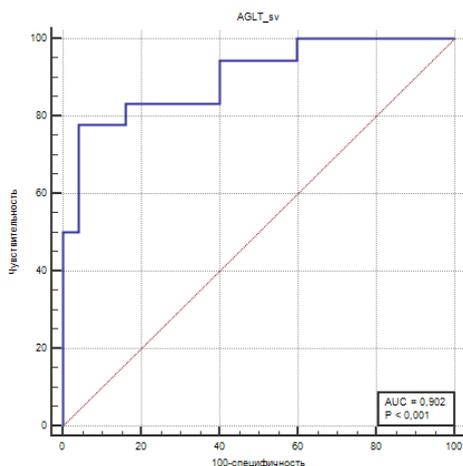
Таблица 8. Разность начальной и конечной ОП при проведении глицеринового теста с кровью сразу после взятия в группах. Приведены медиана (Me), нижний (25) и верхний (75) квартили

Показатель	Группы		
	НС (наследственный сфероцитоз)	ГА (гемолитические анемии)	«здоровые» лица
ГТ-0 (у.е.)	949,5 (894,0; 1256,0)*	952,5 (888,0;987,0)**	573,0 (517,0;732,0)

Непараметрический ранговый U-критерий Манна Уитни

\*достоверные различия ( $p < 0,05$ ) между группами НС и «здоровые»

\*\*достоверные различия ( $p < 0,05$ ) между группами ГА и «здоровые»



Пороговое значение  $\geq 864$  у.е.  
 Чувствительность 77,78%  
 Специфичность 96,00%

Рисунок 3. ROC-кривая глицеринового теста, проводимого на крови сразу после взятия для выявления пациентов с НС.

Глицериновый тест, проводимый с кровью сразу после взятия, не обладает достаточной чувствительностью для надежной диагностики НС. В связи с этим, тест повторили после 24 часовой инкубации при комнатной температуре. Полученные результаты приведены в таблице 9 и на рисунке 4.

Чувствительность и специфичность теста составили 94% и 98,7% соответственно. Пороговое значение составило  $\geq 968$  у.е.

Как видно из представленных данных инкубирование крови 24 часа при комнатной температуре позволило увеличить диагностическую значимость теста.

Таблица 9. Разность начальной и конечной ОП при проведении глицеринового теста с инкубированной кровью в группах. Приведены медиана (Me), нижний (25) и верхний (75) квантили

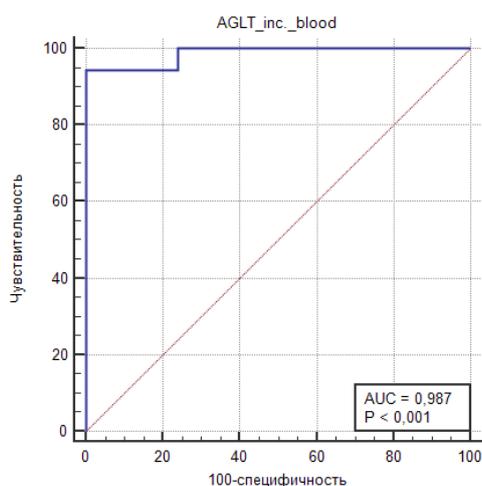
Показатель	Группы		
	НС (наследственный сфероцитоз)	ГА (гемолитические анемии)	«здоровые» лица
ГТ_инк	1843 (1094;1957) */**/**	965 (901;1000)	586 (530;745)

Непараметрический ранговый U-критерий Манна Уитни

\*достоверные различия ( $p < 0,05$ ) между группами НС и «здоровые»

\*\*достоверные различия ( $p < 0,05$ ) между группами НС и ГА

\*\*\*достоверные различия ( $p < 0,05$ ) между группами ГА и «здоровые»



Пороговое значение  $\geq 968$   
 Чувствительность 94,44  
 Специфичность 98,7

Рисунок 4. ROC-кривая для глицеринового теста, проводимого с инкубированной кровью для основной группы (НС).

Помимо количественной оценки скорости лизиса эритроцитов (в у.е.), возможна визуальная оценка графиков кинетики лизиса эритроцитов. Это позволяет оценить скорость лизиса при пограничных значениях ГТ, а также это важно для контроля протекающей в кювете реакции, поскольку такой график отображает изменение ОП в любую секунду теста.

Примеры графиков, полученных с автоматического биохимического анализатора Sapphire-400 представлены на рисунках 5 А, Б, В.

Изучение кинетики гемолиза эритроцитов у пациентов основной группы (НС) отчетливо показало наличие двух фаз: в начальный период, который у всех пациентов составлял от 50 до 100 с, снижение оптической плотности происходило быстрее, чем во второй. Лизис эритроцитов при выполнении глицеринового теста протекает быстрее у пациентов с НС по сравнению с иными видами ГА или здоровыми лицами. Данный феномен может быть обусловлен нестойкостью мембраны микросфероцитов, которые составляют

значительную долю клеток эритроидного ростка в периферической крови больных НС.

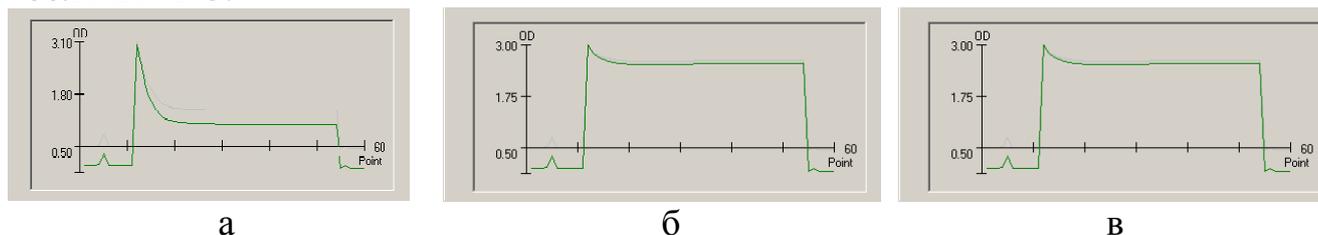


Рисунок 5. Графическое представление скорости лизиса эритроцитов у пациентов: А - основной группы (НС), Б – группы сравнения (ГА), В – контрольной группы («здоровые» лица)

Следовательно, проведение глицеринового теста на определение скорости лизиса эритроцитов может использоваться для подтверждения наличия у пациента микросфероцитарной анемии.

#### Тест на связывание красителя эозин – 5 – малеимида.

Полученные значения СИФ (%) с использованием метода проточной цитометрии и красителя эозин-5-малеимида образцов крови пациентов всех групп и «здоровых лиц» представлены в таблице 10.

Таблица 10. Средняя интенсивность флюоресценции для пациентов основной (НС), группы сравнения (ГА) и контрольной группы («здоровые» лица).

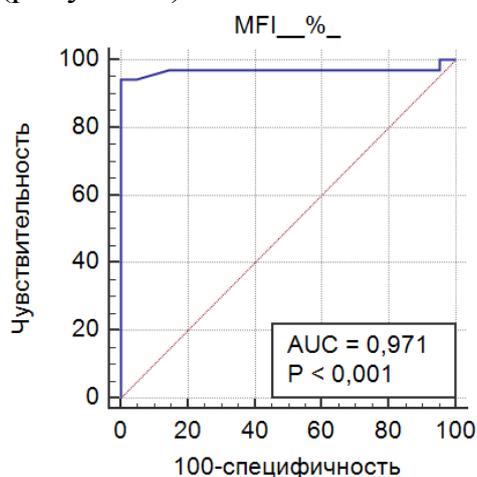
параметр	НС (наследственный сфероцитоз)	ГА (гемолитические анемии)	«здоровые» лица
СИФ, %	79 <sup>*/**</sup>	96	97

Непараметрический ранговый U-критерий Манна Уитни

\*достоверные различия ( $p < 0,05$ ) между группами НС и «здоровые»

\*\*достоверные различия ( $p < 0,05$ ) между группами НС и ГА

Чувствительность и специфичность теста составили 94,44% и 100% соответственно, что соответствует литературным данным [Stoya B., 2006] (рисунок 6).



Пороговое значение	$\leq 86\%$
Чувствительность	94,44%
Специфичность	100,00%

Рисунок 6. ROC-кривая для показателя СИФ.

Полученные данные легли в основу лабораторного алгоритма диагностики наследственного сфероцитоза, который предполагает 3 этапа (рисунок 7).

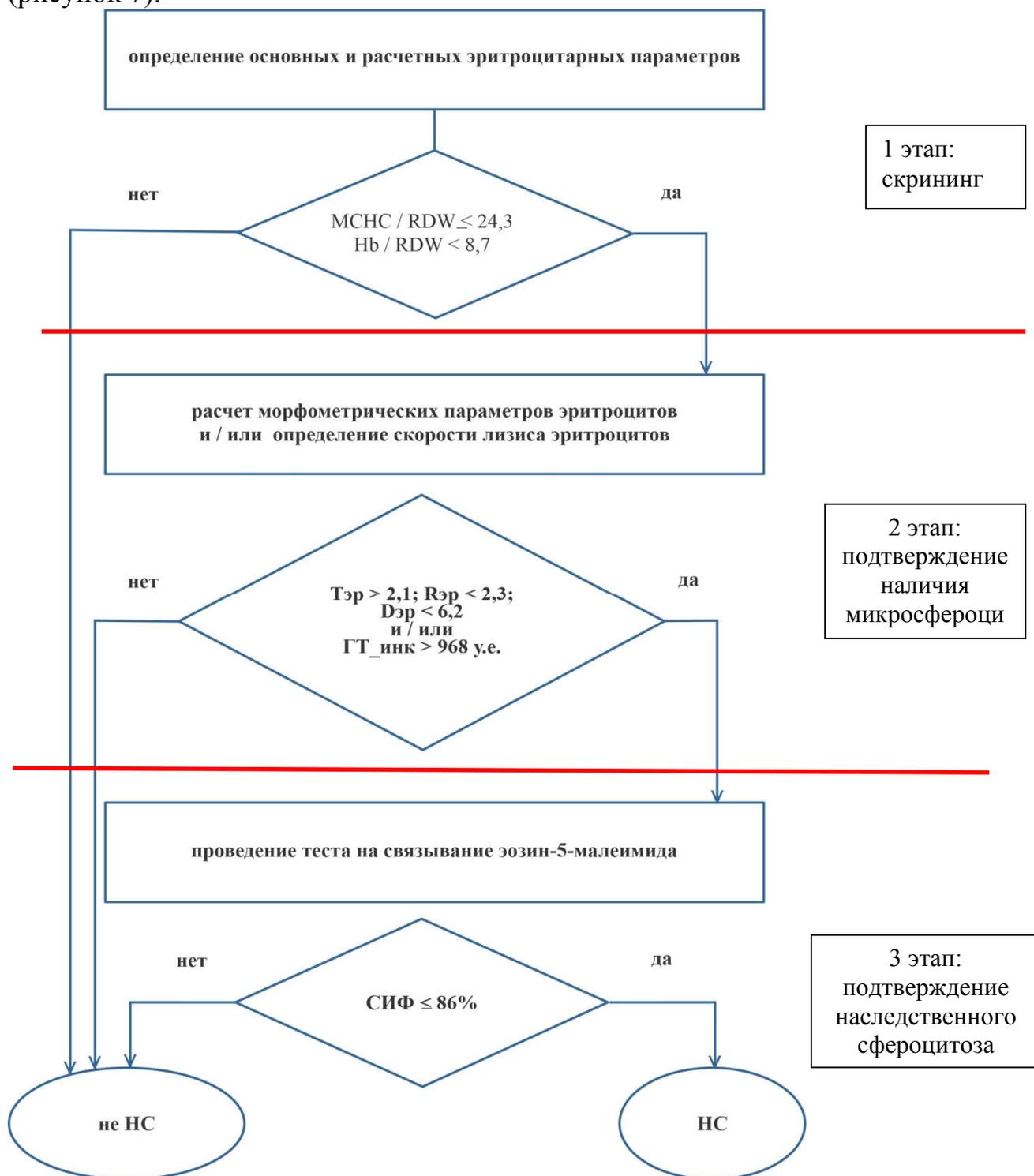


Рисунок 7. Алгоритм лабораторной диагностики наследственного сфероцитоза.

Первый этап - это клинический анализ крови, в результате которого на основании двух расчетных индексов (Hb/RDW и/или MCHC/RDW) при первичном обследовании групп клинически бессимптомных лиц можно

выделить группу пациентов с высокой вероятностью наличия наследственного сфероцитоза.

На втором этапе у пациентов с подозрением на НС проводится морфометрия эритроцитов в окрашенных мазках периферической крови с использованием АПК и/или определение скорости лизиса эритроцитов с инкубированной кровью в глицериновом тесте для подтверждения наличия сфероцитов.

Третий этап – это подтверждение наследственного характера заболевания (сфероцитоза) по оценке мембраны эритроцитов с помощью теста на связывание красителя эозин-5-малеимида.

Предложенная схема позволит выявить латентные формы НС и провести дифференциальный диагноз гемолитических анемий, протекающих с появлением микросфероцитов в крови.

По нашему мнению, предложенный лабораторный алгоритм выявления пациентов с НС может использоваться для выявления пациентов с НС при проведении клинического анализа крови в централизованных клинико-диагностических лабораториях (ЦКДЛ). Он не требует дополнительных финансовых вложений, поскольку эритроцитарные индексы MCHC/RDW и Hb/RDW рассчитываются с использованием эритроцитарных параметров, полученных с помощью гематологического анализатора. При этом алгоритм позволит провести как скрининг наиболее распространенного типа гемолитической анемии, так и подтверждение диагноза наследственного сфероцитоза при наличии проточного цитометра при помощи теста на связывание красителя эозин-5-малеимида. Внедрение предложенных интегральных эритроцитарных индексов в ЛИС и данного алгоритма в лабораторную практику медицинских организаций позволит проводить направленный поиск пациентов с НС и обеспечить создание реестра таких пациентов. Ранняя диагностика НС позволит снизить риск ошибок при дифференциальной диагностике различных видов гемолитических анемий и необоснованную лекарственную терапию. Кроме того, своевременная постановка диагноза НС освободит пациента и медицинскую организацию от ненужных дополнительных обследований.

Таким образом, разработанный лабораторный алгоритм диагностики позволит у пациентов с высокой вероятностью НС провести дифференциальную диагностику с другими видами гемолитических анемий и установить наличие наследственного сфероцитоза, своевременно назначить соответствующую терапию, тем самым решить важную социально-значимую задачу по улучшению качества медицинской помощи данной категории пациентов.

## **ВЫВОДЫ**

1. Данные клинического анализа крови, в результате которого на основании эритроцитарных и двух расчетных индексов (MCHC/RDW и Hb/RDW), а также наличия микросфероцитов в окрашенных мазках крови

можно выделить группу пациентов, требующих дальнейшего проведения дифференциального диагноза.

2. Использование в клиничко-диагностических лабораториях систем анализа изображения позволяет при микроскопическом анализе выявлять параметры эритроцитов, необходимые для дифференциальной диагностики анемий.

3. Проведение глицеринового теста для определения скорости лизиса эритроцитов с использованием инкубированной крови может использоваться для подтверждения наличия у пациента микросфероцитарной анемии.

4. Высокотехнологичный метод проточной цитометрии позволяет выявлять сохранность структуры цитоскелета эритроцитов в 100% случаев наследственного сфероцитоза.

5. Разработанный лабораторный алгоритм диагностики у пациентов с высокой вероятностью наследственного сфероцитоза позволяет провести дифференциальную диагностику с другими видами гемолитических анемий и установить наличие наследственного сфероцитоза.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Для врачей клинической лабораторной диагностики, гематологов, педиатров, терапевтов:

1. Одновременно с оценкой эритроцитарных параметров, полученных при помощи гематологического анализатора, рекомендуется рассчитывать интегральные эритроцитарные индексы Hb/RDW, MCHC/RDW (с использованием значения Hb в г/л).

2. Пациентам с микросфероцитарной анемией следует оценивать морфометрические показатели эритроцитов и скорость лизиса эритроцитов.

3. Если у пациента выявлена высокая скорость лизиса эритроцитов, то следует проводить исследование связывания красителя эозин – 5 – малеимида.

4. Диагноз НС подтверждается тестом на связывание эозин – 5 - малеимида.

5. Для целенаправленного автоматического поиска пациентов с высокой вероятностью наследственного сфероцитоза рекомендуется внедрение интегральных эритроцитарных индексов в лабораторные информационные системы (ЛИС).

### **ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Разработанные методические подходы позволяют осуществлять изучение особенностей выявления других вариантов ГА, а также разработку лабораторных подходов для подтверждения диагноза НС. В качестве перспектив разработки темы можно рассматривать внедрение предложенного алгоритма, как возможность выявления пациентов с НС на базе клиничко-диагностических лабораторий.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

**Статьи в научных журналах и изданиях, входящих в перечень рецензируемых Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ для опубликования основных результатов диссертационных исследований по специальности 14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика**

1. Асатрян, Т.Т. Современные подходы к лабораторной диагностике микросфероцитарных анемий / Т.Т. Асатрян, М.Н. Зенина, Л.Б. Гайковская // Медицинский алфавит. – 2019; 3 (22). Современная лаборатория. – С. 22–27.
2. Асатрян, Т.Т. Значимость глицеринового теста с графическим определением скорости лизиса эритроцитов для скрининга наследственного сфероцитоза / Т.Т. Асатрян, Л.Б. Гайковская, В.В. Слепышева // Трансляционная медицина. 2019;6(6) – С. 26-34.
3. Асатрян, Т.Т. Использование лабораторного алгоритма диагностики наследственного сфероцитоза. Разбор клинического случая / Т.Т. Асатрян, Л.Б. Гайковская, М.Н. Зенина // Профилактическая и клиническая медицина. 2021; 3(80) – С. 71-75. DOI: 10.47843/2074-9120\_2021\_3\_71.
4. Асатрян, Т.Т. Разработка алгоритма лабораторной диагностики наследственного сфероцитоза / Т.Т. Асатрян, М.Н. Зенина, Н.Ю. Черныш, Л.Б. Гайковская // Лабораторная служба. - 2018. - 3 (2). - С. 21-22.

### **Статьи, тезисы докладов в материалах конференций**

5. Асатрян, Т.Т. Клинико–лабораторный профиль наследственного сфероцитоза / Т.Т. Асатрян, М.Н. Зенина, Н.Ю. Черныш, Л.Б. Гайковская // Вестник Северо – Западного государственного медицинского университета им. И. И. Мечникова. – 2019; 11(1). – С. 65-72.
6. Асатрян, Т.Т. Использование глицеринового теста на определение скорости лизиса эритроцитов в диагностике наследственного сфероцитоза / Т.Т. Асатрян, М.Н. Зенина, Н.Ю. Черныш // «Трансляционная медицина: от теории к практике»: Сборник материалов 4-й научно-практической конференции молодых ученых и специалистов/ под ред. д.м.н. А.В. Силина. – СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И.И. Мечникова. - 2016. – с. 14.
7. Асатрян, Т.Т. Морфометрические параметры эритроцитов при наследственном сфероцитозе / Т.Т. Асатрян, М.Н. Зенина, А.В. Козлов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2016. - 61(9). – с. 515.
8. Черныш, Н.Ю. Особенности лабораторной диагностики анемий у пациентов старшей возрастной группы / Н.Ю. Черныш, М.Н. Зенина, Ю.И. Жиленкова, Т.Т. Асатрян // Клиническая лабораторная диагностика. – 2016. - 61(9). – с. 609.
9. Асатрян, Т.Т. Использование глицеринового теста для оценки скорости лизиса эритроцитов при наследственном сфероцитозе / Т.Т. Асатрян // «Трансляционная медицина: от теории к практике»: Материалы 5-й научно-практической конференции молодых ученых и специалистов / под ред. д.м.н. А.В. Силина. - СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И.И. Мечникова. - 2017. – С. 15-16.

10. Асатрян, Т.Т. Случай сочетания наследственного сфероцитоза и синдрома Жильбера у одного больного / Т.Т. Асатрян, М.Н. Зенина, С. С. Бессмельцев // Гематология и трансфузиология. - 2018. - 63(1). - с. 114.
11. Асатрян Т.Т. Диагностика врожденных состояний патологии эритроидного роста / Т.Т. Асатрян, Ю.И. Жиленкова, М.Н. Зенина, В.А. Зиминая, Л.Б. Гайковская // Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине: сборник научных трудов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. 3 декабря 2020 года / Под ред. А.В. Силина, Л.Б. Гайковской. Ч. 1. – СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2020. – С. 198-205
12. Asatryan, T.T. The possibility of using a hardware software complex for image analysis in the diagnosis of hereditary spherocytosis / T.T. Asatryan, M.N. Zenina, S.S. Bessmeltsev, A.V. Kozlov // Proceedings of the 2nd European Conference on Biology and Medical Sciences. Premier Publishing s.r.o. Vienna. 2017. Pp. 27-28.

### Список сокращений

АПК – аппаратно – программный комплекс

ГА – гемолитическая анемия

КАК – клинический анализ крови

НС – наследственный сфероцитоз

ОП – оптическая плотность

СИФ – средняя интенсивность флюоресценции

ФСБ - фосфатно-солевой буфер

ЦКДЛ – централизованная клиничко-диагностическая лаборатория

ЭМА-тест – тест на связывание красителя эозин-5-малеимида

Hb - гемоглобин

HCT – гематокрит

MCH – среднее содержание гемоглобина в эритроцитах

MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах

MCV – средний объем эритроцитов

RBC – количество эритроцитов

RDW – ширина распределения эритроцитов по объему

Rt – ретикулоциты

СПб ГБУЗ «Консультативно-диагностический центр для детей» - Санкт-Петербургское государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Консультативно-диагностический центр для детей»

ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России - федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

ФГБУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА России» - Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства»